基础研究

轴抑制因子通过β-catenin调控MMP7、MMP9影响淋巴瘤细胞的侵和袭转移

李志晋,叶晶珠,詹丽英,郑马亮
中国人民解放军第184医院血液科,江西 鹰潭 335000

摘要:目的 探讨轴抑制因子(AXIN)通过β-catenin调控MMP7、MMP9对淋巴瘤细胞侵袭迁移能力的影响。**方法** 用RT-PCR和Western blot法观察多株淋巴瘤细胞株里AXIN、β-catenin、MMP7、MMP9的表达情况;选取AXIN相对低表达的淋巴瘤细胞分组瞬时转染pCMV5-HA-Axin和pcDNA5-His-β-catenin质粒,采用RT-PCR和Western blot法观察其细胞中β-catenin、MMP7、MMP9 mRNA及蛋白表达变化;构建稳定高表达AXIN的淋巴瘤细胞后,分组瞬时转染AXIN-shRNA和β-catenin-shRNA后观察β-catenin、MMP7、MMP9 mRNA及蛋白变化;采用Transwell侵袭实验观察空白处理对照组、稳定高表达AXIN组、干扰AXIN的稳定高表达AXIN组细胞侵袭和迁移能力变化。**结果** 多株淋巴瘤细胞株中AXIN与β-catenin、MMP7、MMP9表达呈负相关;选用AXIN相对低表达的人恶性B淋巴瘤细胞株Raji,过表达AXIN后发现AXIN升高后,β-catenin、MMP7、MMP9的蛋白表达降低,MMP7、MMP9 、β-catenin mRNA未变化;当过表达β-catenin后发现MMP7、MMP9 mRNA和蛋白表达升高;另外,稳定高表达AXIN的细胞中干扰AXIN,β-catenin、MMP7、MMP9蛋白表达升高,MMP7、MMP9、β-catenin mRNA未变化;稳定高表达AXIN的细胞中干扰β-catenin,MMP7、MMP9表达降低;证实AXIN通过β-catenin调控MMP7、MMP9影响淋巴瘤细胞的侵袭和迁移。**结论** 在淋巴瘤细胞中升高AXIN可引起β-catenin表达下降,进而MMP7、MMP9表达下降,抑制淋巴瘤细胞的侵袭和迁移。
关键词:AXIN;MMP7;MMP9;淋巴瘤;β-catenin

Overexpression of Axin inhibits lymphoma cell invasion and metastasis *in vitro* by down-regulating β-catenin and MMP7/MMP9

LI Zhijin, YE Jingzhu, ZHAN Liying, ZHENG Maliang
Department of Hematology, 184 Hospital of PLA, Yingtan 335000, China

Abstract: Objective To investigate that the role of Axin in regulating the invasion and migration ability of lymphoma cells and explore the molecular mechanisms. **Methods** The expressions of Axin, β-catenin, MMP7, and MMP9 were detected in different lymphoma cell lines by RT-PCR and Western blotting. A lymphoma cell line with low Axin expressions was transiently transfected with pCMV5-HA-Axin and pcDNA5-His-β-catenin plasmid, and the expressions of β-catenin, MMP7, and MMP9 mRNA and protein were observed. A lymphoma cell model stably overexpressing Axin was transfected with AXIN-shRNA and β-catenin-shRNA, and the changes in β-catenin, MMP7, and MMP9 cexpressions were observed. The changes in the invasion and migration abilities of this cell model were assessed following Axin knockdown. **Results** In the lymphoma cell lines tested, the Axin expression showed a negative correlation with β-catenin, MMP7, and MMP9 expressions. In Raji cells with a low Axin expression, overexpression of Axin resulted in decreased expressions of β-catenin, MMP7, and MMP9 at the protein levels but not the mRNA levels, and overexpression of β-catenin obviously increased MMP7 and MMP9 mRNA and protein expressions. In the cells with stable Axin overexpression, Axin knockdown caused increased expressions of β-catenin, MMP7, and MMP9 at the protein levels but not the mRNA levels, while β-catenin knockdown caused lowered expressions of MMP7 and MMP9 and suppressed cell invasion and migration. **Conclusion** In lymphoma cells, Axin overexpression can decrease the expression of β-catenin, which in turn decreases the expressions of MMP7 and MMP9 to inhibit the cell invasion and migration.
Key words: Axin; MMP7; MMP9; lymphoma; β-catenin

淋巴瘤是起源于淋巴结和淋巴组织的恶性肿瘤,占男性恶性肿瘤发病的第9位,女性第10位,并且发病率每年平均增加,为发病率增长最快的恶性肿瘤,严重威胁着人类健康[1]。因此,研究淋巴瘤的侵袭转移具有重要意义。轴抑制因子(AXIN)是在Fused的小鼠突变株中克隆得到的。AXIN是一种细胞内架构蛋白,与Wnt信号通路的活性密切相关[2-3]。AXIN在多种肿瘤细胞中呈现低表达[4]。研究报道在正常细胞中Axin介导β-catenin磷酸化和降解,使Wnt通路保持低活性状态。当AXIN表达下调时,就会使β-catenin不能被有效磷酸化和降解,而在浆(或核)内异常蓄积入核,启动许多相

收稿日期:2015-10-22
作者简介:李志晋,副主任医师, E-mail: gastricz@163.com
通信作者:郑马亮,主治医师, E-mail: haoweipei104@163.com

关癌基因转录,影响细胞的生物活性[5]。研究报道过表达AXIN可以明显抑制肿瘤细胞的侵袭和转移,然而,其机制仍不清楚。目前研究报道MMPs(基质金属蛋白酶家族)与肿瘤的侵袭转移能力密切相关。过表达MMPs蛋白可以明显促进肿瘤细胞的侵袭和转移[6]。MMP7 、MMP9是基质金属蛋白酶家族中的重要成员,对细胞外基质包括基底膜均有降解作用,从而破坏了机体防御肿瘤浸润与转移的能力,增加了肿瘤的浸润性[7-9]。最近有研究报道AXIN过表达下调β-catenin可抑制肺癌细胞侵袭[10],但AXIN如何调控淋巴瘤细胞的侵袭转移的机制仍不清楚。在研究中,我们在淋巴瘤细胞中改变AXIN的表达,观察MMP7、MMP9的表达和淋巴瘤细胞的侵袭和迁移能力的变化,并对AXIN调控MMP7和MMP9的表达的机制进行了研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人淋巴瘤细胞株Ramos、Raji、U937、SNK-6、HUT-78、Daudi购自美国ATCC,α-MEM培养液和胎牛血清购自美国Gibco,Lipofectamine™ LTX and Plus Reagent转染试剂盒购自美国Invitrogen,G418购自北京索莱宝科技有限公司,TRIzol试剂、PrimeScript™ RT reagentKit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)和SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,RIPA裂解液购自北京普利莱基因技术有限公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所,兔抗人AXIN 、β-catenin 、MMP7、MMP9和α 微管蛋白(α-Tubulin)多克隆抗体购自美国Proteintech,山羊抗兔IgG(二抗)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,化学发光检测试剂盒购自北京天根生物科技有限公司;限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ、*Xba*Ⅰ,T_4DNA连接酶,pyrobest DNA聚合酶,*Dpn*Ⅰ酶,质粒提取试剂盒,DNA凝胶回收试剂盒,一步法RT反转录试剂盒及大肠杆菌DH5α感受态细胞购自大连宝生物公司(TaKaRa);设计的AXIN、β-catenin 等序列及相关引物由上海生工公司合成;pCMV5-HA、pcDNA5-His 质粒购自promega;AXIN-shRNA、β-catenin-shRNA购自上海吉玛制药技术有限公司

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染淋巴瘤细胞 置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养,用含10%胎牛血清的α-MEM培养液换液传代培养。选取AXIN低表达的Raji细胞后,,按新型脂质体Lipofectamine™ LTX and Plus Reagent转染试剂说明用不含10%胎牛血清的α-MEM培养液进行转染,分别转染pCMV5-HA-Axin和pcDNA5-His-β-catenin及共转,设置空白对照组,于转染4~6 h后更换含有10%胎牛血清的α-MEM培养液中继续培养,48 h后质粒高表达期提取细胞RNA和总蛋白。在稳定高表达AXIN的Raji细胞中,采用相同方法及分组转染干扰质质粒。

1.2.2 设计引物及构建pCMV5-HA-Axin和pcDNA5-His-β-catenin质粒 根据Genbank的基因序列设计引物,具体见表1。提取人淋巴瘤细胞Raji和Daudi中的总RNA,以总RNA为模板反转录为cDNA。进行PCR扩增反应,利用T4 DNA连接酶连接β-catenin全长片段与pcDNA5-His空载体,连接Axin全长片段与pCMV5-HA载体,然后将连接产物转化到DH5α感受态大肠杆菌,扩增后抽提质粒DNA,酶切及测序验证。

表1 PCR引物序列、产物大小及复性温度

Tab.1 PCR primers, product length and anealing temperatures

Gene	Primer sequence	Product length(bp)	Anealing Temperature
AXIN	Sence:5'-CTGGTGTCCTTGCTGATAC-3' Antisence:5'-TGTCTTGGTCGTTGTCTTC-3'	184	55.4
β-catenin	Sence:5'-ACCTGAGACTGGATGTAGAA-3' Antisence:5'-GCTGGAATGACAACTGGAT-3'	158	53.2
MMP7	Sence:5'-AGGCTCAGGACTATCTCAA-3' Antisence:5'-CCACTGTAATATGCGGTAAG-3'	276	51.9
MMP9	Sence:5'-GGAAGATGCTGCTGTTCA-3' Antisence:5'-CCACCTGGTTCAACTCAC-3'	210	57.8
GAPDH	Sence:5'-CATCACCATCTTCCAGGAG-3' Antisence:5'-AGGCTGTTGTCATACTTCTC-3'	213	56.1

1.2.3 构建稳定高表达AXIN的Raji细胞 取对数生长期的人淋巴瘤细胞Raji细胞接种于6孔板中（2×10^5细胞/孔），待细胞融合度为70%~80%时，按Lipofectamine™ LTX and Plus Reagent转染试剂盒说明书提供的方法分别将重组载体pCMV5-HA-Axin质粒和阴性对照载体转染至Raji细胞。转染48 h后，加入1000 μg/mL的G418进行筛选，有阳性克隆长出时，在荧光显微镜下标记后挑取单克隆细胞进行培养，在96孔板中以有限稀释法筛选和纯化稳定转染的单克隆细胞并扩大培养，培养过程中应用500 μg/mL G418维持培养。荧光显微镜下观察筛选后各组细胞绿色荧光蛋白的表达情况。成功转染重组载体质粒后的细胞称pCMV5-HA-Axin-Raji。

1.2.4 实时荧光定量PCR法检测各基因的mRNA表达水平 收集未经处理的多种淋巴瘤细胞株细胞以及过表达AXIN或β-catenin的Raji细胞、干扰AXIN或β-catenin的稳定高表达细胞，应用TRIzol试剂和PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)分别提取各组细胞的总RNA，并将其反转录成cDNA反应条件：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s），随后以此cDNA为模板应用SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseHPlus）进行PCR扩增。PCR反应条件：95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s，共40个循环。以$2^{-\Delta\Delta Ct}$值表示各基因mRNA的相对表达水平。

1.2.5 蛋白质印迹法检测各基因蛋白的表达水平 收集未经处理的多种淋巴瘤细胞株细胞以及过表达AXIN或β-catenin的Raji细胞、干扰AXIN或β-catenin的稳定高表达细胞，用RIPA裂解液提取细胞总蛋白，BCA法测定蛋白质浓度。取20 μg/孔蛋白质进行10% SDSPAGE，将电泳分离后的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜上，用含5%脱脂奶粉的封闭液于室温下封闭1 h；加入1∶1000稀释的抗AXIN和α-Tubulin（内参照）抗体，4 ℃反应过夜；TBST

漂洗3次，加入1∶10 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或羊抗鼠IgG（二抗），室温反应1 h；TBST漂洗3次，加入化学发光试剂显影成像，应用Image Lab软件进行蛋白条带灰度值的分析。以目的蛋白条带的灰度值与内参照α-Tubulin蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.2.6 Transwell侵袭实验检测细胞侵袭和迁移能力 使用Transwell检测空白处理对照组、稳定高表达AXIN组、干扰AXIN的稳定高表达AXIN组细胞的侵袭能力变化。取对数期生长的Raji细胞，经过胰酶消化下来，低速离心后，大约按2×10^5细胞数加入到每个小室，用不含血清的培养液进行培养，放置在含有10%的血清培养液的24孔板上，放置在5% CO_2、37 ℃封闭环境内孵育24 h，甲醛固定20 min，用0.1%结晶紫染色20 min，用PBS洗3遍。显微镜（×200）下计数迁移至滤膜外表面的细胞数，取平均值，实验重复3次。

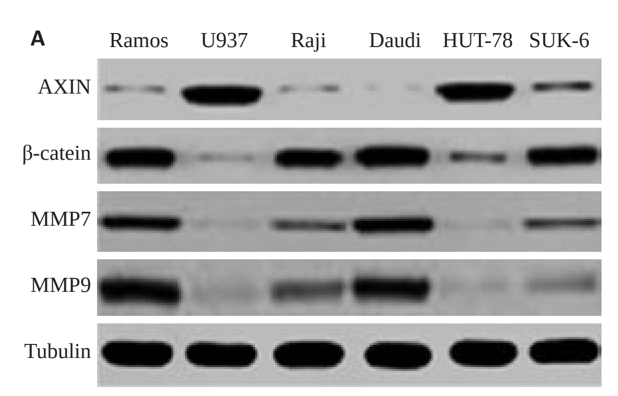
1.3 统计学方法

采用SPSS19.0统计软件，数据以均数±标准差表示，两组间数据的比较采用t检验，多组间数据的比较采用方差分析，组间两两比较采用Tukey法或Dunnett's T_3法进行分析，$P<0.05$为差异有统计学意义。本研究中的所有实验均重复3次。

2 结果

2.1 在多株淋巴瘤细胞株里AXIN、β-catenin、MMP7、MMP9的表达情况

用RT-PCR和Western blotting法观察多株淋巴瘤细胞株里AXIN、β-catenin、MMP7、MMP9的mRNA及蛋白表达情况。结果发现：观察蛋白水平，Raji细胞中AXIN相对低表达；当AXIN升高时，β-catenin、MMP7、MMP9降低，当AXIN降低时，β-catenin、MMP7、MMP9呈升高趋势（图1）。推测AXIN与β-catenin、MMP7、MMP9呈负相关。



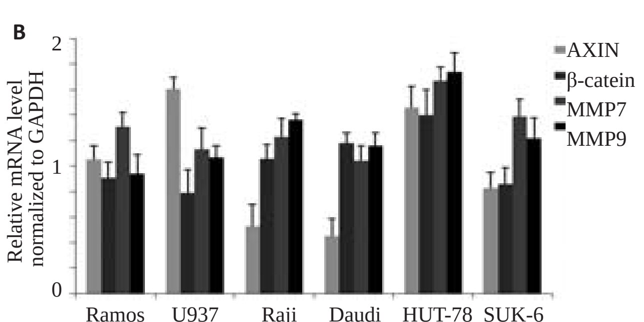


图1 在多株淋巴瘤细胞株里AXIN、β-catenin、MMP7、MMP9的表达情况

Fig.1 Expression of Axin, β-catenin, MMP7 and MMP9 at the protein (*A*, Western blotting) and mRNA (*B*, qRT-PCR) in different lymphoma cell lines.

2.2 在Raji和HUT-78细胞中过表达和干扰AXIN或β-catenin对MMP7、MMP9的影响

对于Raji细胞组分空白对照组、pCMV5-HA-

Axin、pcDNA5-His-β-catenin、pcDNA5-His-β-catenin+pCMV5-HA-Axin这4组,HUT-78细胞组分空白对照组、AXIN-shRNA、β-catenin-shRNA和AXIN-shRNA+β-cateni-shRNA这4组。采用RT-PCR和Western blot法检测各个基因的蛋白及mRNA水平。图2A结果显示:过表达Axin的细胞中,β-catenin、MMP7、MMP9蛋白水平较空白对照组明显下降,MMP7、MMP9、β-catenin mRNA未变化;过表达β-catenin的细胞中,MMP7、MMP9蛋白及mRNA水平较空白对照组明显升高,而Axin未见明显变化;过表达Axin和过表达β-catenin的细胞中,β-catenin、MMP7、MMP9表达较过表达β-catenin组明显下降。图2B HUT-78细胞株的结果与Raji细胞株的蛋白水平结果相反,mRNA水平结果同样说明Axin不影响β-catenin、MMP7、MMP9的mRNA。说明蛋白水平,升高Axin可以下调β-catenin、MMP7、MMP9的表达水平,而且Axin可以恢复过表达β-catenin产生的影响。

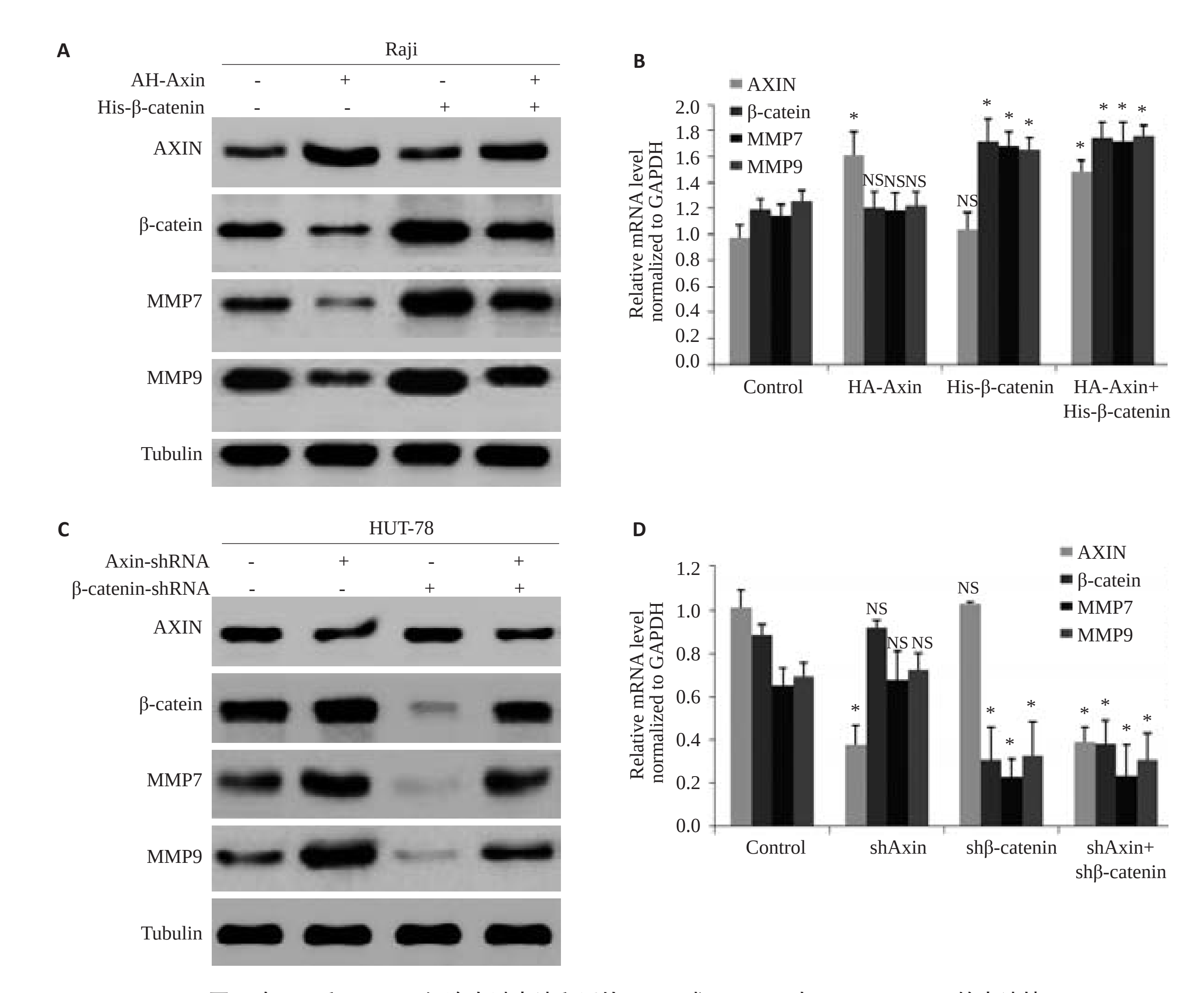
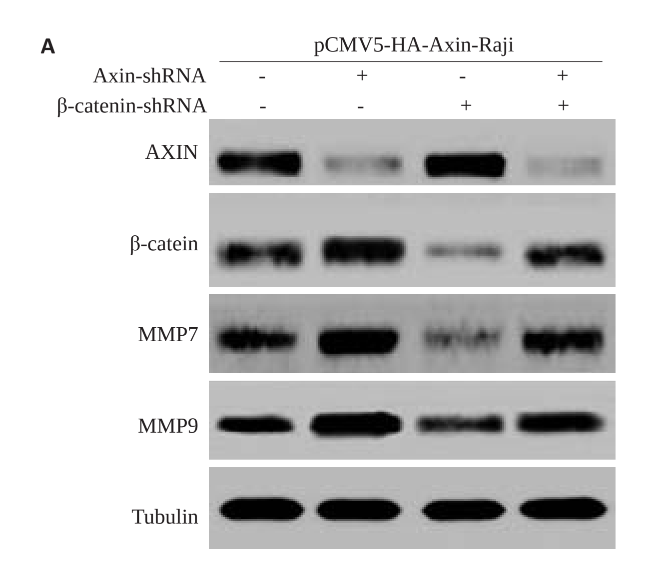


图2 在Raji和HUT-78细胞中过表达和干扰AXIN或β-catenin中MMP7、MMP9的表达情况

Fig.2 Expression of MMP7 and MMP9 in Raji and HUT-78 cells after overexpressing and interfering AXIN or β-catenin. *A*: Protein expressions in Raji cells; *B*: mRNA levels in Raji cells; *C*: Protein expressions in HUT-78 cells; *D*: mRNA levels in HUT-78 cells. *$P<0.05$. NS: No significance.

2.3 在稳定高表达AXIN细胞中干扰AXIN或β-catenin对MMP7、MMP9的影响

在稳定高表达Axin的Raji细胞中,分四组分别转染空白干扰片段、AXIN-shRNA、β-catenin-shRNA、AXIN-shRNA+β-catenin-shRNA。用RT-PCR和Western blot技术分别检测各个基因表达情况。结果显示:构建稳定高表达Axin的Raji细胞株成功;干扰Axin的pCMV5-HA-Axin-Raji后,β-catenin、MMP7、MMP9蛋白水平较空白干扰组明显升高,MMP7、MMP9、β-catenin mRNA未变化;干扰β-catenin的pCMV5-HA-Axin-Raji后,MMP7、MMP9表达较空白干扰组明显下降,而Axin未见明显变化;干扰Axin和β-catenin的细胞后,β-catenin、MMP7、MMP9表达较干扰β-catenin组明显升高(图3)。说明降低Axin可以上调β-catenin、MMP7、MMP9的表达水平,而且Axin可以恢复干扰β-catenin产生的影响。



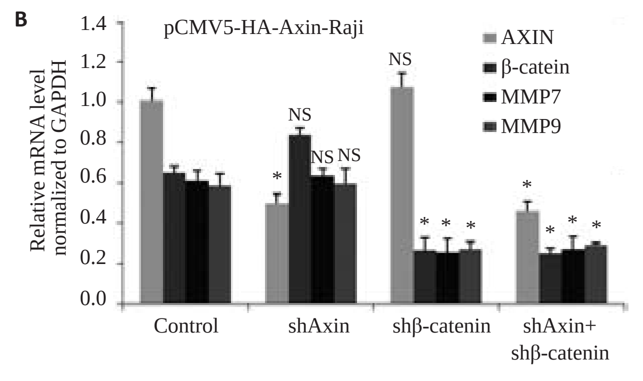


图3 在稳定高表达AXIN细胞中干扰AXIN或β-catenin中MMP7、MMP9的表达情况

Fig.3 Expression of MMP7 and MMP9 proteins (*A*) and mRNA (*B*) in cells overexpressing Axin after AXIN or β-catenin knockdown. *$P<0.05$. NS: No significance.

2.4 AXIN调节MMP7、MMP9对淋巴瘤细胞侵袭能力的影响

Transwell侵袭实验结果显示：稳定高表达Axin组Raji细胞穿膜细胞数48±2.74明显低于空白处理对照组90±6.63及干扰AXIN的稳定高表达AXIN组76±4.69（P=0.024，图4）。

3 讨论

在全球范围内，恶性淋巴瘤的发病率近30年来已高达20/10万。在我国恶性淋巴瘤也已是常见肿瘤第8位，发病率高达6/10万~7/10万[11]。而且淋巴细胞分布全身各部，一旦恶变，手术切除效果有限，临床治疗需结合放化疗[12]。生物治疗已成为恶性淋巴瘤的第四治疗方式。无论何种治疗方式，淋巴瘤的浸润和转移是造成预后不良患者死亡的主要原因。本文从转移相关基因MMP7、MMP9开始研究，进一步研究了AXIN-β-catenin-MMP7/MMP9转移机制轴。为了研究AXIN在淋巴瘤细胞的侵袭和转移的内在机制，我们进一步实验发现改变Axin后，发现β-catenin的蛋白含量明显发生变化，而β-catenin mRNA水平无明显变化，证实AXIN虽然不影响β-catenin的转录，但通过诱导其降解可以显著下调β-catenin在细胞内的含量，这与其他实验室的研究结果一致。

先前研究报道过，肿瘤细胞发生侵袭时，肿瘤细胞通过扩散并逐渐侵入细胞外基质（ECM），肿瘤细胞和基质细胞通过分泌蛋白酶导致ECM的降解，从而使基底膜缺损，肿瘤细胞可以由这种方式进入血管，向远处

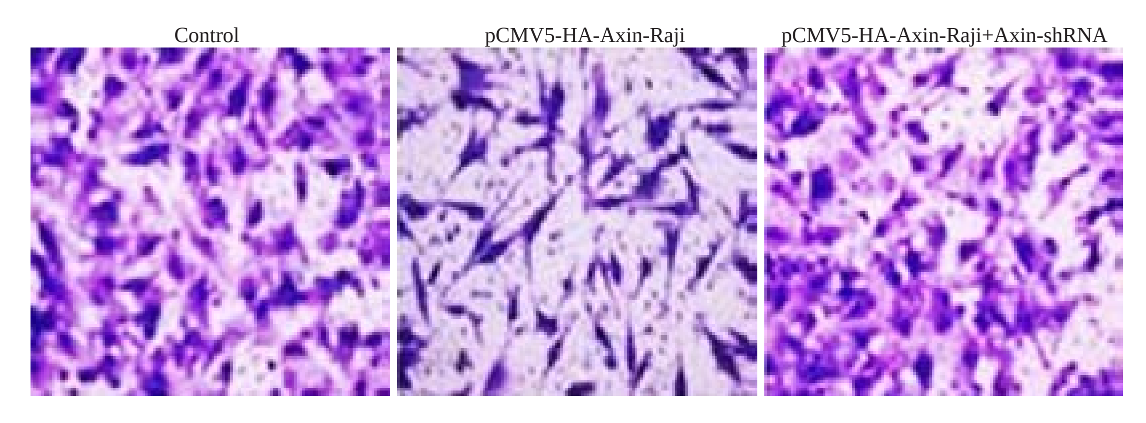


图4 AXIN调节MMP7、MMP9对淋巴瘤细胞侵袭能力的影响

Fig.4 Effect of Axin-mediated regulation of MMP7 and MMP9 on invasion ability of lymphoma cells.

进行转移[13-14]，肿瘤细胞或肿瘤间质组织产生降解ECM的主要是蛋白水解酶，目前认为最为重要的是基质金属蛋白酶系列（MMPs）[15]。MMP7、MMP9属于MMPs家族中的一员，而且MMP7、MMP9是MMPs家族最重要的蛋白酶之一[16]。AXIN与肿瘤的转移研究并非我们首次报道，AXIN是1997年从一种称为Fused的小鼠突变株中克隆到的基因[17]。AXIN以构架蛋白的形式在Wnt信号转导途经中起负调节作用[18]。Xu等[19]研究认为AXIN的表达减少与肿瘤的TNM分期和淋巴结转移相关，并是食管鳞癌进展的重要原因之一，这与我们在淋巴瘤里研究一致。非小细胞肺癌中研究存在着AXIN的表达减少时，出现β-catenin的核蓄积和肺癌的

低分化[20]，我们在淋巴瘤中研究也发现AXIN与β-catenin呈负相关。大量研究证实AXIN能与Wnt信号途径中的许多成员相互结合从而影响wnt/β-catenin信号通路影响细胞的功能。β-catenin是经典的cadherin-catenin复合体和Wnt通路的重要成员，其异常蓄积对肿瘤的恶性增殖和侵袭转移有重要作用[21-22]。AXIN作为调控β-catenin蛋白降解的关键分子，对保持Wnt通路的低活性状态，调节细胞的增殖和凋亡具有重要作用[23]。这与我们研究结果相一致，说明AXIN在诱导β-catenin降解和分布，抑制肿瘤发生、发展和侵袭方面发挥重要作用。AXIN与MMP7、MMP9的关系并没有学者研究过，我们首次在实验中发现AXIN相对低表达的Raji细胞中转染过表达AXIN质粒后，与侵袭相关的靶基因MMP-7、MMP9表达减少，进而导致淋巴瘤细胞的侵袭转移能力减弱，而共转染β-catenin质粒会使淋巴瘤细胞的侵袭转移能力恢复；在稳定高表达AXIN的Raji细胞中转染Axin-shRNA，MMP7、MMP9表达上升，进而导致淋巴瘤细胞的侵袭转移能力增强，当共转染β-catenin-shRNA会使淋巴瘤细胞的侵袭转移能力下降。证明β-catenin在AXIN和MMP7、MMP9之间起着桥梁作用。

综上所述，肿瘤细胞浸润转移过程中最为重要的过程无疑是ECM的降解导致的，研究已证实MMPs是降解ECM的重要蛋白水解酶家族，能降解ECM和BM所有成分从而导致肿瘤细胞的侵袭和转移[24-26]。而且我们首次证实AXIN通过β-catenin调控侵袭相关的靶基因MMP-7、MMP9的表达，进而影响淋巴瘤细胞侵袭转移能力。本研究阐述了AXIN抑制淋巴瘤细胞的侵袭转移能力的机制，为淋巴瘤靶向治疗提供了新的理论依据和实验基础。

参考文献：

[1] 马 莉，马梁明. 格列卫对恶性淋巴瘤细胞Raji凋亡和增殖的实验研究[J]. 山西大同大学学报: 自然科学版, 2010, 26(2): 65-8.

[2] Pećina-Slaus N, Martić TN, Kokotović T, et al. AXIN-1 protein expression and localization in glioblastoma[J]. Coll Antropol, 2011, 35(Suppl 1): 101-6.

[3] Hida T, Nakamura F, Usui H, et al. Semaphorin3a-induced axonal transport mediated through phosphorylation of axin-1 by GSK3β[J]. Brain Res, 2015, 1598(14): 46-56.

[4] 杨连赫，马 爽，徐洪涛，等. Axin通过负向调控Wnt通路抑制A549细胞系增殖[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(1): 21-4.

[5] Behrens J, Jerchow BA, Würtele M, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta[J]. Science, 1998, 280(5363): 596-9.

[6] Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview[J]. Front Biosci, 2006, 11(6): 1696-701.

[7] Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9) J]. J Biol Chem, 1997, 272(46): 28823-5.

[8] Watelet JB, Bachert C, Claeys C, et al. Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis[J]. Allergy, 2004, 59(1): 54-60.

[9] Thorns V, Walter GF, Thorns C. Expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 and MMP-11 in human astrocytic and oligodendroglial gliomas[J]. Anticancer Res, 2003, 23(5A): 3937-44.

[10] Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, et al. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin[J]. J Biol Chem, 1998, 273(18): 10823-6.

[11] 张玉玲，庹吉妤，郑荣寿，等. 中国2009年恶性淋巴瘤发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(5): 338-43.

[12] 陈为民. 老年弥漫大B细胞淋巴瘤的特点与治疗进展[J]. 实用老年医学, 2014, 122(6): 464-8.

[13] Waterland RA, Dolinoy DC, Lin JR, et al. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused[J]. Genesis, 2006, 44(9): 401-6.

[14] 金利华，李勤喜，叶志云. Axin在Wnt信号转导途径中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(4): 289-95.

[15] Xu HT, Wang L, Lin D, et al. Abnormal beta-catenin and reduced axin expression are associated with poor differentiation and progression in non-small cell lung cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2006, 125(4): 534-41.

[16] 刘树立，徐洪涛，杨连赫，等. Axin过表达下调β-catenin和TCF-4表达并抑制肺癌BE1细胞的增殖和侵袭[J]. 中国肺癌杂志, 2009, 12(4): 277-82.

[17] Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(2): 119-25.

[18] Willert K, Shibamoto S, Nusse R. Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex[J]. Genes Dev, 1999, 13(14): 1768-73.

[19] Wiechens N, Heinle K, Englmeier L, et al. Nucleo-cytoplasmic shuttling of Axin, a negative regulator of the Wnt-beta-catenin Pathway[J]. J Biol Chem, 2004, 279(7): 5263-7.

[20] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(5): 224-30.

[21] Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological Consequences[J]. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10(5): 602-8.

[22] Oberhauser AF, Marszalek PE, Erickson HP, et al. The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin[J]. Nature, 1998, 393(6681): 181-5.

[23] Di Girolamo N, Mccluskey P, Lloyd A, et al. Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(3): 671-9.

[24] Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries[J]. J Dent Res, 2006, 85(1): 22-32.

[25] Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies[J]. J Hepatol, 2007, 46(5): 955-75.

[26] Sutnar A, Pesta M, Liska V, et al. Clinical relevance of the expression of mRNA of MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and CEA tissue samples from colorectal liver metastases[J]. Tumour Biol, 2007, 28(5): 247-52.

（编辑：孙昌朋）